ВІДГУК

офіційного опонента, професора кафедри клінічної фармакології ІПКСФ Національного фармацевтичного університету, доктора фармацевтичних наук, професора Цубанової Наталі Анатоліївни на дисертаційну роботу Дорошенко Анни Ігорівни «СОРБЦІЙНА ТА ПРОТИМІКРОБНА ЕФЕКТИВНІСТЬ КОМПОЗИТУ НАНОДИСПЕРСНОГО КРЕМНЕЗЕМУ З ПОЛІГЕКСАМЕТИЛЕНГУАНІДИНУ ГІДРОХЛОРИДОМ», представлену до спеціалізованої Вченої ради Д 64.605.03 при Національному фармацевтичному університеті на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія

Актуальність теми. Розробка та впровадження у медичну практику антибіотиків різко знизила захворюваність і смертність людей від інфекційних захворювань. Наприклад, захворюваність і смертність людей від туберкульозу значно знизилися після введення стрептоміцину і канаміцину. Однак поява патогенних бактерій із множинною лікарською стійкістю знову різко змінила ситуацію. Більш того, множинна антибіотикорезистентність стає все більш проблемною для клінічної практики. ВООЗ звертає увагу на інфекції, особливо *Klebsiella pneumoniae, Mycobacterium tuberculosis, Neisseria gonorrhoeae*, харчові токсикоінфекції, лікувати які стає все важче, або зовсім неможливо. Летальність пацієнтів, через антибіотикорезитентість багатьох бактерій набуває катастрофічного масштабу. Як зазначає, у своєму клінічному дослідженні Йохансен Т.Б. (2020) антибіотикорезистентність *E. coli* за 2-3 роки збільшилась з 35% до більш ніж 60%. Для багатьох бактерій стійкість до ципрофлоксацину збільшилася з 15% в 2013 році до приблизно 45% на сьогодняшній день. Показник смертності від антибіотикорезистентності за даними різних досліджень становить близько 5-10%, але показує тенденцію до стрімкого зростання.

Стійкість до антибіотиків в основному виникає через активацією клітиною механізмів відтоку антибіотиків, запобігання взаємодії антибіотиків з мішенню шляхом мутації, модифікації і захисту мішені і модифікації антибіотиків. Ці механізми є результатом власної структурної або функціональної стійкості бактеріальної клітини, набутої стійкості у результаті мутаційних змін або горизонтального переносу генів, а також адаптивною стійкістю до антибіотиків.

Поряд з природною концепцією, що продуценти антибіотиків повинні мати механізми ауторезистентності для запобігання їх гибелі, була висунута гіпотеза, що гени ферментів, що модифікують антибіотики, еволюціонували в бактеріях, які продукують антибіотики, і були передані патогенним бактеріям за допомогою трансформації або трансдукції. Ця гіпотеза беззастережно приймалася до недавнього часу. Однак тривале зловживання і надмірне використання антибіотиків призвело до широкого поширення антибіотиків, а також генів стійкості до антибіотиків по всьому навколишньому середовищу (аквакультура, поверхневі води, ґрунти і т. д.). Отже, ознаки множинної лікарської стійкості взаємно мігрували серед різних бактерій, що мешкають в цих середовищах.

Особливої актуальності проблема антибіотикорезистентності набуває зараз, коли у період пандемії COVID-19, кількість споживання антибіотиків населенням всього світу зросла у рази. Особливо загрозливим це питання стає для країн, де населення може придбати антибактеріальний препарат у аптеці самостійно, без рецепта лікаря. Зазначене, дозволяє передбачити, ще більш агресивне збільшення антибіотикорезистентності у наступні 5-10 років.

Доцільність створення препаратів із принципово новим механізмом антибактеріальної дії є клінічною необхідністю.

Перспективним об’єктом з фармакологічної точки зору є композит нанодисперсного кремнезему з полігексаметиленгуанідину гідрохлоридом (НДК+ПГМГ-ГХ).

Створення вітчизняного лікарського засобу із антибактеріальною та сорбційною активністю на основі НДК+ПГМГ-ГХ є фармакологічне обґрунтуваним та актуальним для сучасної фармації та медицини.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота виконана в рамках НДР кафедри фармакології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України за темою «Експериментальні дослідження нанодисперсного кремнезему з гуанідином» (№ державної реєстрації 0115U004157).

Обсяг та структура дисертації

Матеріали дисертації викладено на 172 сторінках комп'ютерного тексту. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали та методи дослідження», 3-х розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків, списку використаних джерел, який включає 131 посилання, з них 84 кирилицею та 47 латиницею. Робота ілюстрована 25 рисунками та 39 таблицями.

Основний зміст дисертації та його оцінка

Вступ характеризується загальноприйнятим порядком викладення матеріалу. Дисертант спочатку характеризує актуальність обраної теми, про що свідчать посилання літератури, які підтверджують доцільність створення нових лікарських форм на основі композиту нанодисперсного кремнезему з полігексаметиленгуанідином гідрохлоридом, як антимікробного та сорбційного засобу. У вступі автором сформульовано мету та задачі дослідження, наведено наукову новизну, практичне значення отриманих результатів та інформацію щодо публікацій та апробації результатів досліджень.

Огляд літератури висвітлює місце сорбентів та катіонів дезінфектантів як перспективних засобів із антимікробною та сорбційною дією. У першому підрозділі дисертант систематизує дані літератури щодо опікових травм. Увага акцентована на інфекційному виклику, який супроводжує та ускладнює перебіг процесів у рані. Дисертантом, на основі аналізу літератури та узагальнення виокремлено основні інфекційні збудники, такі як грампозитивні *Staph-*

ilococcus aureus, Staphilococcus epidermidis та грамнегативні *E.coli, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae*, дріжджові гриби *Candida glabrata* та ін.

Доведено, що інфекційний процес перешкоджає репаративним процесам у рані, з іншого боку сучасні антимікробні засоби для місцевого застосування та лікування ранового процесу характеризуються високою антибіотикорезистентністю, в першу чергу це стосується пеніцилінів та макролідів.

У другому підрозділі огляду літератури автор розкриває роль та місце медичних сорбентів у медичній практиці. Введення засобів із сорбційною дією значно покращує перебіг ранового процесу, розриває патологічний ланцюг та покращує лімфодетоксикаційну, лімфодренажну та імуномодулюючу активності організму.

Досить детально у третьому підрозділі наведено фармакологічні властивості полігексаметиленгуанідину гідрохлориду та інших катіонних біоцидів. Автор зазначає, що багато місцевих антимікробних засобів із антисептичною дією, такі як хлоргекседину біглюконат, мірамістин є цитотоксичними для кератиноцитів і фібробластів і можуть перешкоджати загоєнню ран.

Перспективною сполукою можна вважати полігексаметиленгуанідину гідрохлорид, який дозволить отримати баланс між антимікробною дією у опіковій рані та низьким потенційним ризиком погіршення процесів репарації. Молекули полігексаметиленгуанідину єдині водорозчинні сполуки, які утворюють на оброблених поверхнях наноплівку, що довго зберігається.

Нанодисперсному кремнезему, як ефективному сорбенту присвячено четвертий підрозділ огляду літератури. Детально проаналізовано можливості використання наноматеріалів у фармакології. Автором, на основі проведених експериментальних досліджень вітчизняних науковців, резюмовано, що нанодисперсний кремнезем у композиті здатний забезпечити лімфосанацію, захистити непошкоджені клітини, а також модулювати антимікробну дію полігексаметиленгуанідину гідрохлориду.

Автор вважає, що залишається актуальною проблемою розширення асортименту лікарських форм із антимікробною та сорбційною дією для терапії

інфікованої опікової рани. Розробка, дослідження та впровадження лікарських форм на основі полігексаметиленгуанідину гідрохлориду у композиції із нанодисперсним кремнеземом дозволить удосконалити місцеву терапію інфікованих ран.

У розділі **«Матеріали та методи дослідження»** автор досить детально описує всі використані фармакологічні, мікробіологічні, імуноферментні, токсикологічні, гістологічні, біохімічні методи дослідження та методи математичної статистики та планіметрії.

Об'єктом дослідження став композиту нанодисперсного кремнезему з полігексаметиленгуанідином гідрохлоридом.

Експериментальні дослідження *in vivo* проведені на 71 білих мишах та 48 безпорідних білих щурах. Для дослідження *in vitro* використовували 6 еталонних тест штамів умовно-патогенних мікроорганізмів. Також у системі *in vitro* вивчали сорбційну активність досліджуваного об'єкту.

Слід відзначити, що автор також приділяє увагу дослідженню фармакокінетичного параметру нанодисперсного композиту (визначення вивільнення полігексаметиленгуанідину гідрохлориду з композиту) та визначенню антибіоплівкової активності.

Біотичні аспекти досліджень погоджені з Комітетом з біоетики НМУ ім. О.О. Богомольця. Статистична обробка фактичного матеріалу проведена адекватними методами. Використання сучасної методології досліджень свідчить про високий методичний рівень роботи.

Результати власних досліджень наведені автором в трьох розділах.

У третьому розділі дисертант приводить результати дослідження параметрів гострої токсичності композиту НДК+ПГМГ-ГХ на мишах за умов нашкірного нанесення та внутрішньошлункового введення.

Було встановлено, що нанодисперсний композит можна віднести до VI класу токсичності – відносно нешкідливі речовини (А. В. Стефанов, 2002) за умов нашкірного нанесення та до IV класу токсичності – малотоксичні речовини при внутрішньошлунковому введенні.

Четвертий розділ присвячено дослідженню сорбційних та антимікробних властивостей нанодисперсного композиту із полігексаметиленгуанідином гідрохлоридом у системі *in vitro*. Дослідження сорбційних властивостей нового композиту проводили «точково», шляхом вимірювання величини адсорбції у стандартних умовах із використанням стандартних маркерних речовин: метиленового синього, ціанокобаламіну, сироваткового альбуміну людського, желатину у середовищі із pH 6,0, що відповідає рівню кислотності ранової поверхні. Дисертантом встановлено, що композит проявляє виражену сорбційну активність щодо низько- та середньомолекулярних сполук (метиленовий синій, ціанокобаламін), яка перевищує ефективність препаратів порівняння силіксу та ентеросгелю у 5-11 разів. Сорбційна активність щодо високомолекулярних сполук (сироватковий альбумін людський, желатин) у рази поступається референс препаратам.

Визначення протимікробної активності композиту щодо планктонних форм мікроорганізмів, проведено автором на наступному етапі. Доведено, що максимальну антимікробну дію новий композит виявляє у відношенні до *S. aureus* та *C. albicans*.

Важливим для розуміння антибактеріальної дії композиту НДК+ПГМГ-ГХ було вивчення впливу на інтенсивність формування біоплівки *P. aeruginosa* 449 у стаціонарній системі на склі та із застосуванням мікропланшету. Відомо, що у клінічній практиці, мікробіом, у тому числі патогенний, знаходиться саме у вигляді біоплівок, тому вивчення нових препаратів стандартними методами (метод колодязів, серійних розведень), не дає змогу оцінити реальну антибактеріальну дію або її відсутність. Важливими показниками антимікробних засобів є вплив на формування біоплівки та її деструкцію.

Дисертантом встановлено, що антибіоплівкова активність нового композиту перевищує ефективність дії гентаміцину та ципрофлоксацину за зменшенням кількості клітин у планктонній формі. Слід відзначити, що автором досліджено як вплив нового композиту на формування біоплівки так і на сформовану біоплівку. Відзначено, що композит НДК+ПГМГ-ГХ є ефективним,

щодо планктонної форми *P. aeruginosa* 449, а превентивне застосування композиту у концентрації 40 мкг/мл призводить до повного руйнування біоплівки із знищенням бактеріальних клітин.

Досліджено також вплив нового композиту на рухову активність *P. aeruginosa*. Встановлено, що досліджуваний композит виявляє дозозалежний інгібуючий ефект на свіммінг-міграцію синьогнійної палички, незначний вплив на свормінг- міграцію та ефективність, що перевищує вплив гентаміцину та ципрофлоксацину на твітчінг-міграцію.

Дисертантом вивчено також вплив композиту НДК+ПГМГ-ГХ на гідрофобність клітин синьогнійної палички.

У п'ятому розділі висвітлені результати дослідження фармакологічних властивостей композиту НДК+ПГМГ-ГХ *in vivo*. Враховуючи особливості перспективного клінічного застосування нового композиту для загоєння ранового процесу, зокрема й опікової рани вивчено його вплив на моделі опікової рани у щурів. Встановлено, що застосування досліджуваного композиту прискорювало загоєння опікової поверхні, та статистично значуща перевищувало ефективність препарату порівняння хлоргекседину.

Досліджено вплив на рівень проти- та прозапальних цитокінів у крові і вогнищі ушкодження опікової рани. Автором встановлено що при застосуванні композиту НДК+ПГМГ-ГХ, відновлюється цитокіновий профіль крові, різко порушений унаслідок термічного опіку. Композит знижував до норми концентрацію прозапального цитокіну IL-1β, нормалізував вміст IL-10 та TNF-α як в осередку ураження так і у сироватці крові. Слід відзначити, що новий композит вірогідно перевищував вплив референс-препарату хлоргексидину.

Аналогічна дінаміка змін зареєстрована і для вмісту загальних метаболітів азоту, загальних нітрит-аніонів та нітратів нормалізація вмісту яких відбулася під впливом композиту НДК+ПГМГ-ГХ.

Важливим показником є також здатність нового композиту відновлювати баланс ПОЛ-АОС.

Отримані клінічні, біохімічні показники фармакологічної дії композиту НДК+ПГМГ-ГХ підтверджені результатами проведених морфологічних досліджень змін шкіри за умов термічного ураження.

Аналіз та узагальнення результатів викладені у відповідності з послідовністю завдань роботи та окремих розділів дослідження. Автор у повній мірі володіє сучасними знаннями з наукової проблеми вдосконалення та оптимізації топічної терапії ранової поверхні. Отримані результати грамотно проаналізовані.

Логічний стиль викладу аналізу результатів, дозволив автору систематизувати отриманий матеріал і зробити науково обґрунтовані висновки, які відповідають поставленій меті і завданням дисертаційної роботи.

Список використаних джерел літератури містить 175 посилань, що оформлені відповідно до чинних вимог, 50% із наведених писилань датовано останніми 10 роками.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації, їх достовірність

Дисертація Дорошенко А. І. виконана на високому науковому рівні із використанням сучасних методів фармакологічних, мікробіологічних, імуноферментних, токсикологічних, гістологічних та біохімічних досліджень, достатньої кількості лабораторних тварин та методик *in vitro* та визначенням інформаційних показників. Достатня кількість фактично отриманих показників оброблена із використанням статистичних методів, достовірність отриманих результатів не викликає сумнівів. Експериментально отримані показники наведені у вигляді таблиць, рисунків та графіків. Наукові положення і висновки дисертаційної роботи засновані на методичних принципах, що відповідають поставленим завданням, є теоретично і експериментально обґрунтованими і логічно випливають з отриманих результатів. Теоретичні припущення, що робить автор та висновки дисертації базуються на результатах власних досліджень і цілком відображають встановлені закономірності, що були з'ясовані під час експериментальних досліджень.

Зазначене дає підставу вважати, що наукові положення та висновки дисертаційної роботи Дорошенко А. І. є повністю обґрунтованими, узгодженими з метою і завданнями дослідження.

Наукова новизна одержаних результатів

У роботі теоретично обґрунтовано та експериментально доведено переваги впровадження нового композиту нанодисперсного кремнезему та полігексаметиленгуанідину гідрохлориду.

Дисертантом вперше проведено вивчення токсикологічного профілю нового композиту. Встановлено, що досліджуваний об'єкт має перспективи у подальшому клінічному використанні через низьку токсичність, яка визначена двома шляхами, за допомогою внутрішньошлункового введення на нашкірних аплікацій.

Фармакологічні дослідження композиту НДК+ПГМГ-ГХ проводили у системі *in vitro* та *in vivo*. Досліджено сорбційні та антимікробні властивості нанодисперсного композиту. Сорбційна активність нового композиту більш висока до низько- та середньомолекулярних сполук. Вперше встановлено специфіку антимікробної дії композиту, із виокремленням максимально чутливих до нього мікроорганізмів.

Вивчено вплив композиту НДК+ПГМГ-ГХ на інтенсивність формування біоплівки *P. aeruginosa* 449 та на можливість руйнування сформованої біоплівки у стаціонарній системі на склі та із застосуванням мікропланшету.

Дисертантом встановлено, що антибіоплівкова активність нового композиту перевищує антибіоплівкову дію гентаміцину та ципрофлоксацину за зменшенням кількості клітин у планктонній формі.

За результатами проведених досліджень, автором доведено, що новий композит ефективно впливає на показники свіммінг-міграції, свормінг- міграції та твітчінг-міграції синьогнійної палички. Причому за останнім показником досліджуваний композит перевищує вплив гентаміцину та ципрофлоксацину.

На моделі опікової рани у щурів дисертантом встановлено, що застосування нового композиту виявляє високу репаративну активність, нормалізує рівень проти- та прозапальних цитокінів у крові і вогнищі ушкодження опікової рани. Автором встановлено позитивний вплив композиту НДК+ПГМГ-ГХ на динаміку вмісту загальних метаболітів азоту, загальних нітрит-аніонів та нітратів. Доведено антиоксидантну дію нового композиту. Дані морфологічного дослідження змін шкіри за умов термічного ураження підтвердили репаративну дію композиту НДК+ПГМГ-ГХ.

Новизна підтверджена 2 патентами України на корисну модель.

Практичне значення одержаних результатів

Результати проведених досліджень обґрунтовують доцільність створення вітчизняного оригінального топічного засобу на основі композиту НДК+ПГМГ-ГХ із протимікробною, сорбційною та репаративною дією для лікування термічних та інфікованих ушкоджень шкіри.

Дисертант є співавтором нового способу визначення гострої токсичності композиту нанодисперсного кремнезему та полігексаметиленгуанідину гідрохлориду (патент України на корисну модель, № 124891U, 2018 р.) та способу визначення протимікробної активності композиту нанодисперсного кремнезему та полігексаметиленгуанідину гідрохлориду (патент України на корисну модель, № 124891U, 2018 р.). За результатами дисертаційного дослідження видано інформаційний лист № 211 про нововведення у сферу охорони здоров’я «Іноваційні підходи до фармакологічної корекції опікових ран з використанням композиту нанодисперсного кремнезему з полігексаметиленгуанідину гідрохлоридом»; автори: Г. В. Зайченко, А. І. Дорошенко, Н. О. Горчакова, Є. П. Воронін.

Результати дослідження впроваджені в навчальний процес п’яти кафедр фармакології медичних ЗВО України.

Повнота викладу матеріалів дисертації
в опублікованих роботах і в авторефераті

Матеріали дисертаційної роботи опубліковані у 7 статтях, з них 6 розміщені у фахових виданнях, рекомендованих МОН України для публікації результатів дисертаційних робіт, 1 стаття – у профільному закордонному виданні. Основні положення дисертації оприлюднені на 5 наукових форумах різного рівня, відповідно опубліковано 5 тез доповідей.

Автореферат за змістом відповідає суті дисертаційної роботи і в ньому повністю розкриті головні її положення.

Недоліки дисертації та автореферату по їх змісту та оформленню

Суттєвих недоліків в дисертаційній роботі та авторефераті не виявлено. Робота повністю відповідає сучасним вимогам щодо структури, змісту та технічного оформлення. Існують деякі недоліки та дискусійні моменти:

1. У розділі 2 «Матеріали та методи дослідження» бажано вказати № та дату затвердження протоколу Комітету з біоетики НМУ ім. О.О. Богомольця (с.51).
2. При дослідженні антимікробної дії композиту НДК+ПГМГ-ГХ (с.81-85) доцільно було взяти препарат порівняння із антибактеріальної дією і/або сорбційною дією. Такий підхід дав би змогу більш об’єктивно оцінити антибактеріальну дію нового композиту.
3. У деяких рисунках трапляються технічні помилки, так наприклад на рис. 4.8, 4.9, 4.10 не на всіх стовпчиках графічно виставлена похибка середньої, дещо здвинулися показники вірогідності, що утруднює сприйняття.
4. Було б доцільно обґрунтувати вибір хлоргекседину, антисептика, що не має топічної форми, як вибір препарату порівняння для лікування опікової рани. Тоді як, значні успіхи в скороченні частоти виникнення ранового опікового сепсису досягнуті завдяки використанню сучасних топічних засобів: ЛП антимікробної дії, антисептики, сульфаніламіди (мазі: лінкоміцинова, тетрациклінова, синтоміцинова, фурацилінова, діоксидинова, левосін) протизапальної дії (мазі фторокорт, локакортен, преднізолон та ін.)

протеолітичної та кератолітичної дії (саліцилова мазь); стимулятори регенерації (мазі метилурацилова, солкосерил) та ін.

5. Морфологічні результати дослідження повинні бути представлені у рисунках стандартного розміру, який зазвичай становить 9 на 13 см, тоді як дисертант надає всі рисунки у різному форматі, наприклад: 10 на 15 см (рис.5.5); 8,7 на 11,7 см (рис.5,6): 8,4 на 14,7 см (рис.5.7); 11 на 16,5 см (рис.5.9) і. т. п.
6. Подекуди зустрічаються граматичні помилки.

Наведені зауваження принципово не змінюють оцінку дисертаційної роботи. У плані дискусії хотілося б почути думку дисертанта з наступних питань:

1. Поясніть, внаслідок яких чинників під час вивчення гострої токсичності за умов внутрішньошлункового введення летальність тварин, що отримувала 400 мг/кг розчину ПГМГ-ГХ сягала 58 %, але за умов введення цієї же дози у складі нанодисперсного кремнезему летальність взагалі не реєстрували. І що було причиною смерті у групі, що отримувала розчин ПГМГ-ГХ якщо відносна маса всіх внутрішніх органів без змін, а за даними літератури ця речовина здатна викликати набряк легень, зміни у паренхімі нирок та печінки?
2. При вивченні антимікробної дії методом серійних розведень (підрозділ 4.2) було встановлено, що для всіх досліджуваних еталоних штамів мікроорганізмів антимікробна дія за показниками МІК та МБК полігексаметиленгуанідину гідрохлориду у середньому в 10 разів перевищує ефективність нового композиту. У чому був сенс поєднання біологічно активної речовини із нанодисперсним кремнеземом, коли її активність настільки знижується?
3. Як на вашу думку можна пояснити різнцю впливу нового композиту на свімінг- міграцію (ефективний дозозалежний вплив), свормінг -міграцію (практично відсутність впливу) та твітчінг-міграцію (ефективність вище гентаміцину та ципрофлоксацину) *P. aeruginosa* ?

Висновки

Дисертація Дорошенко Анни Ігоревни «Сорбційна та протимікробна ефективність композиту нанодисперсного кремнезему з полігексаметиленгуанідину гідрохлоридом» є закінченою, самостійною науково-дослідною роботою.

Дисертаційна робота містить науково обґрунтовані положення з фармакології, що в сукупності становлять суттєвий внесок до вирішення актуального науково-практичного завдання фармакології, що полягає у розробці та дослідженні нових засобів для фармакологічної корекції термічних та інфікованих ушкоджень шкіри.

За актуальністю, науковою новизною, практичним значенням, а також обсягом досліджень, дисертаційна робота Дорошенко Анни Ігоревни «Сорбційна та протимікробна ефективність композиту нанодисперсного кремнезему з полігексаметиленгуанідину гідрохлоридом» за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів і вчених звань» МОН України, а дисертант заслуговує присудження йому наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 14.03.05 - фармакологія.

Професор каф. клінічної фармакології
ІПКСФ НФаУ, д. фарм. н. Н.А. Цубанова

Національний фармацевтичний університет УКРАЇНА №02109 місто Харків
Інститут підвищення кваліфікації спеціалістів фармації

Підпис засвідчую Н.А. Цубанової
Провідний спеціаліст
ЗК ІПКСФ О.Г. Бресич